

ゲノムDNA分離 クイックガイド

DNA組織キット編

QuickGene DNA tissue kit L (DT-L)



このシートは、組織からゲノムDNAを分離する手順を、キットハンドブック・取扱説明書から抜粋したものです。キットハンドブック・取扱説明書をよく読み、正しくご使用ください。



適切な保護手袋、および保護めがねを着用して作業を行ってください。

step1 準備

目的のゲノムDNA分離を行うために、下記のものをご準備ください。

1 準備

QuickGene-Mini8L
DNA組織キット (DT-L)



特級エタノール (>99%)

1.5 ml マイクロチューブ (DNA 回収用)

15 または 50 ml 遠沈管 (前処理用)

マイクロピペット (P-1000)

遠心分離機 (2,500x g (3,500 rpm))

ウォーターバス (70°C)

55°Cのシェーカー
(ない場合は恒温水槽等。ときどき攪拌する。)

手袋

保護めがね

10 ml ピペット
または 電動ピペッター



RNase (オプション)

Ribonuclease A / Sigma-Aldrich
Cat. No. R5125 *1, *2
Cat. No. R5500 *1, *2
Cat. No. R6513 *1
Cat. No. R4642

Ribonuclease A / MP Biomedicals
Cat. No. 101076 *1, *2

RNase A / AMRESCO
Cat. No. 0675 *1, *2

RNase A / QIAGEN
Cat. No. 19101

RNase A / Thermo Fisher Scientific
Cat. No. 12091

*1 : 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、15 mM NaClを用いて100 mg/ml溶液を調整してください。

*2 : 100°C 15分処理をしてDnase活性を失活してから使用してください。

チューブミキサー



2 試薬の準備

◆前処理酵素(EDT)

2~8°Cの冷蔵で保存してください。

◆組織溶解液(MDT)

使用前に十分に混和してください。析出物が生じた場合は、55°Cで溶解してください。

◆溶解液(LDT)

使用前に十分に混和してください。析出物が生じた場合は、37°Cで溶解してください。

◆洗浄液 (WDT)

ご使用前のWDTボトルに特級エタノール (>99%) を160ml添加・混合してください。

エタノール添加後は、フタをきちんと閉めて室温で保存してください。

◆回収液 (CDT)

核酸溶出時には、必ずCDTを使用してください。



続いて対応するプロトコールを行います。

step2 プロトコール

目的の収量を得るため、必ず下記の手順で作業を行ってください。

QuickGene DNA tissue kit L (DT-L) は1処理あたり動物組織5 ~ 100 mgに対応しています。
Balb/cマウス(メス、7週齢)の肝臓100 mg から80 µg のゲノムDNA を分離することができます。
回収液量初期値は、500 µlです。回収液量は100 µl まで下げられますが、その場合、溶出効率が低下する可能性があります。

* 動物から切り取った組織は、所定量を直ちに組織溶解液(MDT)へ浸してください。
すぐに使用しない場合は、液体窒素で素早く凍結し、冷凍保存(-20°Cまたは-80°C)してください。
室温で放置したり、凍結、融解を繰り返すと、DNAが分解したり、収量が減少することがあります。

1 準備

- 1) シェーカーを55°Cに設定します。
- 2) 溶解しやすくするために、組織を5mm角程度に小さくカットし、15 ml (もしくは50 ml) 遠沈管に分取します。
- 3) 直ちに組織溶解液(MDT) 1.8 ml、前処理酵素(EDT) 200 µlを添加します。
- 4) 55°Cで数時間から一晩、シェーカーなどを使用し、攪拌しながら組織を完全に溶解します。
- 5) 溶解残渣分(溶け残り、ゼラチン状)を分離除去するために遠心します。(目安:8,000Xg、3分、室温程度)
- 6) 溶解上清液を1.5mlマイクロチューブへ移します。

2 ヒートブロックを70°Cに設定します。

3 QuickGene-Mini8Lに消耗品をセットします。

消耗品のセットに関してはQuickGene-Mini8Lの取り扱い説明書をご参照ください。

4 RNase 処理(オプション)

- 1) 濃度100 mg/mlのRNase を100 µl 添加します。(R4642 (Sigma-Aldrich)を使用する場合)
サンプルの量やRNaseの種類によって添加する量を調整してください。
- 2) ボルテックスを5秒間行い、RNaseをサンプル溶液とよく混ぜます。
- 3) 室温で2分間インキュベーションします。

5 ライセートの作製

- 1) 溶解液(LDT) 1.8 ml を添加し、サンプル液と混合します。
- 2) ボルテックスを15秒間最大回転数(2,500 rpm以上推奨)で行います。
LDT添加時に混合液が白くなることがありますが、70°Cに加温すると溶解します。
- 3) 70°Cにて10分間インキュベーションします。
- 4) 特級エタノール(>99%) 2.4 ml を添加し、サンプル液と混合します。
- 5) ボルテックスを15秒間最大回転数(2,500 rpm以上推奨)で行います。
室温が低い場合、エタノール混合後に白い沈殿ができることがまれにあります。
55°Cに加温し、沈殿を溶解後、室温に戻してから使用してください。

5 ライセート完成

ライセート完成後、30分以内に分離を行ってください。

続いてstep3 分離を行います。

step3 分離

QuickGene-Mini8Lを使って、ゲノムDNAを分離します。

QuickGene-Mini8L分離フロー

分離フロー中の加圧マーク  は下記操作を意味しています。

- ① 消耗品をセットしたホルダをQuickGene-Mini8Lにセットし、カートリッジの1列目が加圧ノズルの真下にくる位置まで押し込む。 ※ホルダセットの手順は装置の取り扱い説明書をご参照ください。
- ② 加圧スイッチをONの位置に回して加圧する。
- ③ カートリッジ内に液が残っていないことを確認してから加圧スイッチをOFFの位置に戻す。
- ④ ホルダをスライドさせ、カートリッジの2列目を加圧ノズルの真下に置き、②と③の手順を行う。
- ⑤ ホルダを装置から取り出す。

